

嘌呤受体 P2Y 在免疫应答中的功能研究进展

张 智, 李再新, 赵志平, 谢万如, 刘章琴

(四川理工学院化学与制药工程学院, 四川 自贡 643000)

摘 要: P2Y 受体是嘌呤受体当中的一个小家族, 属于 GPCRs(G-protein coupled receptors) 代谢型受体, 通过选择性结合胞外核苷酸分子如 ATP、ADP、UTP、UDP 和 UDP-glucose 而激活。P2Y 受体在全身各组织细胞中广泛表达, 调控了细胞的多种生理功能。随着研究的深入, 发现 P2Y 受体及其胞外核苷酸分子在免疫应答过程中亦发挥着重要的调控作用。

关键词: 嘌呤受体; 胞外核苷酸; 信号通路; 免疫应答; 炎症

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

ATP 等胞外核苷酸(extracellular nucleotides) 不仅为生命活动提供了基本的物质和能量基础, 而且还可作为内源性信号分子, 通过选择性结合细胞膜上的嘌呤受体(purinergic receptor, 又称 P 受体), 调节身体的多种生理生化功能, 如机体的生长发育、血液凝集、心血管生理和神经生理等功能。随着研究的深入, 发现嘌呤受体及其胞外核苷酸广泛调控了机体的免疫应答过程, 包括固有免疫应答(innate immune response) 和获得性免疫应答(adaptive immune response), 实现对外来病原的免疫防御、监视和清除作用^[1]。

1 嘌呤受体及其内源性配体

嘌呤受体分为 P1 和 P2 两大类受体。P1 受体又称腺苷受体, 其内源性激动剂为腺苷(adenosine); 而 P2 受体又称核苷酸受体, 其内源性激动剂是胞外核苷酸分子, 包括 ATP、UTP、UDP、ADP 及其衍生物^[2]。按照药理学特征, P2 受体又分为配体门控离子通道型受体(P2X 受体)和 G 蛋白偶联型受体(P2Y 受体)。目前, 已克隆出 7 种 P2X 受体亚型和 8 种 P2Y 受体亚型。7 种亚型的 P2X 受体的内源性配体都是 ATP, 而 8 种 P2Y 受体亚型选择性地结合不同的胞外核苷酸分子^[3](表 1)。目

前, 有关胞外核苷酸分子释放的机制, 主要认为与 Pnx(pannexin-1) 离子通道受体相关, 但释放的确切机制尚未完全明了。在正常生理状态下, 胞外核苷酸分子维持在很低的浓度, 通常低于 10 nM; 而在病理状态下, 如炎症、感染和组织损伤等, 或在生理状态, 如化学刺激、机械牵拉和细胞凋亡等情形下, 细胞可以通过自分泌、旁分泌或泄漏等形式将胞内的核苷酸分子释放至细胞外(可达 100 nM 以上), 作为信号分子选择性地激活嘌呤受体, 激活下游信号通路, 产生相应的生物学效应^[2]。

2 P2Y 受体的主要生理功能及其信号传导通路

P2Y 受体在全身各种组织类型的细胞上表达(表 1), 如 P2Y₁、P2Y₂、P2Y₆ 和 P2Y₁₂ 等, 它们通过选择性结合胞外核苷酸分子, 调控了细胞的生理功能。比如, 嘌呤受体 P2Y₁ 和 P2Y₁₂, 它们可以同时与 ADP 结合并被激活, 进而调控血液的凝集作用。目前, 替卡格雷(ticagrelor) 和氯吡格雷(clopidogrel) 因为能选择性阻断 P2Y₁₂ 的这种功能, 已经被 FDA 批准应用于临床抗血栓药物^[4]。此外, P2Y₁ 受体还参与中枢运动模式的调节和心血管的舒张等作用。而 P2Y₂ 受体主要发现与神经

收稿日期:2012-06-13

基金项目:四川理工学院人才引进项目(2011RC16)

作者简介:张 智(1977-), 男, 四川夹江人, 讲师, 博士, 主要从事分子免疫学方面的研究, (E-mail) zhangzhi02@gmail.com

细胞分化、神经突触递质传递和小胶质细胞迁移吞噬功能相关,进一步研究发现 P2Y₂ 还与动脉粥样硬化、肿瘤等疾病的发生发展密切相关,P2Y₂ 的功能作用已经受到人们的重视。P2Y 如 P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄ 和 P2Y₆ 等受体,选择性结合胞外核苷酸分子 ATP、ADP 和 UDP 等,广泛参与了血管的收缩与舒张作用等心血管的生理功能。然而,另一方面 P2Y 受体的缺陷或过度激活会引起

相关的严重性生理疾病。目前发现 P2Y 受体与动脉粥样硬化、囊性纤维化、慢性炎症、神经退行性疾病、自身免疫性疾病、糖尿病以及肿瘤等疾病的发生发展密切相关,如 P2Y₆。最新研究表明其调控了心血管的炎症反应^[5]。因此,以 P2Y 受体为靶点的新药开发已成为 GPCRs 药物领域的热点之一。

表 1 P2Y 受体亚型及其激动剂和抑制剂

P2Y 受体亚型	组织细胞分布	激动剂	抑制剂
P2Y ₁	表皮和内皮细胞、血小板、免疫细胞、小胶质细胞、破骨细胞等	ADP	MRS2179*, MRS2279*
P2Y ₂	免疫细胞、表皮和内皮细胞、小胶质细胞、破骨细胞、肾小管等	UTP, ATP	INS37217
P2Y ₄	表皮和内皮细胞、小肠、脑垂体、脑组织、免疫细胞等	UTP	PPADS, Reactove blue2
P2Y ₆	表皮和内皮细胞、免疫细胞、破骨细胞、小胶质细胞、脾、肾等	UDP	MRS2578*
P2Y ₁₁	脾、脑组织、小肠、粒细胞等	ATP	Reactove blue2, Suramin
P2Y ₁₃	脾、脑组织、淋巴结、骨髓、肝、胰腺、心、免疫细胞等	ADP, ATP	PPADS, Suramin
P2Y ₁₄	免疫细胞、胎盘、胃、小肠、脾、肺、心、骨髓等	UDP-glucose, UDP-galactose	

* 代表受体选择性或特异性的抑制剂

P2Y 是 GPCRs 受体家族中的一个小家族,通过与其偶联的 G 蛋白激活胞内多种信号转导通路(图 1)^[2]。P2Y_{1,2,4,6,11} 主要与 G_{αq/11} 蛋白偶联,激活 PLC 和 Ca²⁺ 通路。以 P2Y₂ 和 P2Y₆ 受体为例,P2Y₂ 通过偶联 G 蛋白激活 PLC,引起 Ca²⁺ 内流,并激活 PKC 途径,PKC 进一步激活 MAPK 和 Src 通路,进而引起下游转录因子的活化,并调节靶基因的转录表达;而 P2Y₆ 主要通过与其偶联的 Gq/11 蛋白,激活 PLC_β 途径,介导内质网 Ca²⁺ 释放,激活下游信号通路,如 Zhang 等系统阐明了 P2Y₆ 通过 ERK MAPK 经典途径调节了 MCP-1 的表达,促进了宿主抗细菌感染功能^[6]。P2Y_{12,13,14} 主要与 G_{αi/o} 蛋白偶联,通过抑制 cAMP 水平途径,调节胞内下游的信号转导通路。以 P2Y₁₂ 受体为例,P2Y₁₂ 选择性结合 ADP,通过偶联的 G_{αi} 蛋白,抑制细胞内 cAMP 水平,进而调节血小板的凝集作用。

细胞的招募作用,促进了炎症反应^[10-13]。在细胞受到伤害

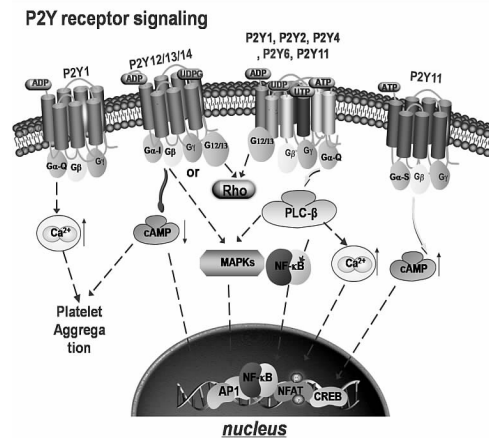


图 1 嘌呤受体 P2Y 可能参与调控的信号转导通路模式图

表 2 P2Y 嘌呤受体在小鼠免疫细胞上的表达

免疫细胞	P2Y 嘌呤受体的表达情况
中性粒细胞	P2Y ₁ 、P2Y ₂ 、P2Y ₆ 、P2Y ₁₂ 、P2Y ₁₄
巨噬细胞	P2Y ₁ 、P2Y ₂ 、P2Y ₆ 、P2Y ₁₂ 、P2Y ₁₄
NK 细胞	P2Y ₁ 、P2Y ₂ 、P2Y ₄ 、P2Y ₆ 、P2Y ₁₂ 、P2Y ₁₃ 、P2Y ₁₄
树突状细胞	P2Y ₁ 、P2Y ₂ 、P2Y ₄ 、P2Y ₆ 、P2Y ₁₃ 、P2Y ₁₄
T 淋巴细胞	P2Y ₁ 、P2Y ₂ 、P2Y ₄ 、P2Y ₆ 、P2Y ₁₂ 、P2Y ₁₃ 、P2Y ₁₄
B 淋巴细胞	P2Y ₁₁

3 P2Y 嘌呤受体在免疫应答中的功能研究

在炎症、感染等情形下,细胞释放内源性核苷酸 ATP、UTP 等至细胞外,常作为危险相关分子模式(danger associated molecular patterns, DAMPs)激活相应的嘌呤受体,调节机体的免疫应答^[7-9]。目前,发现许多免疫细胞,如单核/巨噬细胞、中性粒细胞和 DCs 等免疫细胞,都表达有多种 P2Y 嘌呤受体(表 2)。

3.1 P2Y 嘌呤受体广泛调节机体的固有免疫应答

不同的核苷酸分子作用于细胞(如免疫细胞、内皮细胞、表皮细胞等)的不同 P2Y 受体(如:P2Y₂、P2Y₆等),使细胞表达粘附分子、分泌炎症因子或调节效应细

或死亡时,细胞能很快释放内源性多种核苷酸分子如 ATP、ADP 等,激活相应的 P2Y 嘌呤受体,调节了效应免疫细胞的迁移和吞噬作用^[14-16]。当机体受到感染时,机体细胞可以通过释放核苷酸引发固有免疫的炎症反应,达到杀灭病原体的作用。比如 P2Y₆ 调节多种炎症因子的表达,如 TNF-α、MCP-1、MIP-1α/β 和 IL-6 等^[6,17],在体内促进单核/巨噬细胞等招募作用,提高小

鼠清除入侵细菌的能力^[6]。然而,病原体也可以通过干扰宿主的核苷酸信号,抑制炎症反应并提高病原体的生存。比如,引起肠道疾病的病原体霍乱肠菌、旋毛虫和吸血虫等寄生虫,则在其细胞表面表达或分泌核苷酸代谢酶,达到分解核苷酸的作用,抑制了机体的免疫应答^[17]。但是,机体如果过度释放核苷酸分子,会导致嘌呤受体的过度激活,已表明与呼吸道炎症、动脉粥样硬化、心血管炎症等的发生发展密切相关。在呼吸道炎症病人中,发现胞外核苷酸分子及其 P2Y 受体异常活跃,并促进嗜酸性粒细胞、树突状细胞等炎症细胞的招募作用,加剧了呼吸道炎症反应^[11-12,18-19]。P2Y 嘌呤受体在体内如何去实现促炎症角色,又不至于因过度的炎症造成负面影响的平衡机制,还有待进一步研究。

3.2 P2Y 嘌呤受体调节获得性免疫应答

目前,已有少量关于 P2Y 调控获得性免疫应答的文章报道。抗原呈递细胞 APCs 在固有免疫和获得性免疫之间扮演着承上启下的作用,APCs 细胞通过 MHC I/II 分子将病原的抗原成分呈递给淋巴细胞,进而激活 naïve T/B 淋巴细胞,并启动抗原特异性的获得性免疫应答,产生特异性的体液免疫(如特异性的抗体)和细胞免疫(如 CTL 反应)。APCs 细胞与 T 淋巴细胞的识别与激活作用,往往需要细胞表面表达的共刺激分子的协同作用如 CD86、CD80 和 CD28 等。ATP 能上调了郎格罕细胞(Langerhans cells, LCs) I - A, CD80, CD86, IL - 1 β 和 IL - 12 等的表达,并表明 ATP 及其衍生物可以作为疫苗佐剂促进 LCs 的成熟分化和抗原呈递功能,并提高肿瘤疫苗的免疫原性^[20]。同样,在浆细胞样 DCs(plasmacytoid dendritic cells, PDCs)中观察到,ATP 等胞外核苷酸分子能显著上调了 CD86、CD83 和 CD62L 等分子的表达;Q - PCR 进一步分析表明,PDCs 高表达多种 P2Y 嘌呤受体,暗示 ATP 等胞外核苷酸通过激活 P2Y 受体调节了 PDCs 的成熟分化^[21]。然而,由于缺乏 P2Y 受体特异性的阻断剂,阻碍了 P2Y 受体在 APCs 中的功能机制研究;比如,ATP 通过激活何种嘌呤受体调节了 DCs 的免疫功能,至今并未清楚。最近,Ben Addi 等^[22]应用 P2Y₁₂ 基因敲除小鼠模型,观察到 ADP/P2Y₁₂ 能显著促进 DCs 对 OVA 抗原的吞噬和呈递作用,并激活 OVA 特异性的体液免疫和细胞免疫应答。此外,另一方面,T 淋巴细胞本身也表达 P2X、P2Y 和 P1 等亚型的嘌呤受体,并参与了 T 细胞的免疫调控作用^[23-25]。以 ATP 为例,研究表明 ATP 调节了 T 细胞的激活作用,但是 ATP 的这种功能主要与 P2X₁、P2X₄ 和 P2X₇ 相关,而并非 P2Y₂ 等受体^[26-28]。总之,P2Y 通过各种途径调节机体的获得

性免疫反应,然而目前的研究尚不够深入,其调控的具体机制还需要进一步研究。

3.3 嘌呤受体 P2Y 的抗病毒功能

嘌呤受体 P2Y 的抗病毒功能,目前报道的文献非常有限。pDCs(浆细胞样 DC 细胞)是体内主要负责产生 I 型干扰素的免疫细胞,它高表达 TLR7 和 TLR9 等病毒模式识别受体,识别病毒的 RNA 和 DNA 核酸模式结构分子,并分泌表达大量的 I 型干扰素如 IFN - α/β ,因此在宿主抗病毒免疫反应中扮演了重要的功能。研究表明,pDCs 高表达多种 P2Y 受体,且胞外核苷酸分子(UDP, UTP, ATP, ADP 等)通过嘌呤受体 P2Y 抑制了 pDCs 细胞的 I 型干扰素 IFN - α 的表达^[21]。然而 P2Y 抑制 pDCs 表达 IFN - α 的信号通路机制以及在体内具体的抗病毒活性尚不清楚。pDCs 不如粒性 DCs(Myeloid DCs),其吞噬能力低,抗原呈递能力低,尚不能单一完成对病毒的清除作用。机体对病毒的清除,往往通过多种免疫细胞的协同作用来完成的。在作者参与的前期研究中发现,在巨噬细胞中激活 P2Y₆ 受体,引起 STAT1 等重要抗病毒信号通路的磷酸化激活,并显著上调 I 型干扰素 IFN - α/β 及 RIG - I 的转录表达;同时在体外细胞实验中也证实了 P2Y₆ 的抗病毒功能。这些结果暗示 P2Y 可能通过不同的免疫细胞途径调节了宿主的抗病毒功能,然而到目前为止其确切的机制,以及在体内是否有直接的抗病毒功能还缺乏深入的研究。

4 展望

P2Y 广泛参与了各种慢性炎症性疾病如心血管疾病、呼吸道炎症、肠炎和关节炎等的发生发展过程,目前已经成为开发治疗此类疾病的重要候选靶标。替卡格雷(Ticagrelor)作为 P2Y₁₂ 的阻断剂,已经被批准应用于临床抗血栓药物,而且可以在临床上治疗心血管等慢性炎症性疾病中表现出优良的效果。INS365(UTP 类似物)作为 P2Y₂ 和 P2Y₄ 受体激动剂,正在进行治疗慢性支气管炎和囊性纤维化的 II 期临床试验。随着研究的深入,对每一个嘌呤受体的功能机制的了解,有助于开展针对 P2Y 受体的靶向性药物的开发研究。

参考文献:

- [1] Di Virgilio F,Boeynaems J M,Robson S C.Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity[J].Current Opinion in Pharmacology,2009,9:507-513.
- [2] Lazarowski E R,Boucher R C,Harden T K.Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action

- as P2X-and P2Y-receptor activating molecules[J]. *Mol Pharmacol*,2003,64:785-795.
- [3] Abbracchio M P, Burnstock G, Boeynaems J M, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy [J]. *Pharmacol Rev*,2006,58:281-341.
- [4] Paikin J S, Eikelboom J W, Cairns J A, et al. New antithrombotic agents-insights from clinical trials [J]. *Nature Reviews Cardiology*,2010,7:498-509.
- [5] Riegel A K, Faigle M, Zug S P, et al. Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation[J]. *Blood*,2011, 117:2548-2555.
- [6] Zhang Z, Wang Z, Ren H, et al. P2Y(6) agonist uridine 5'-diphosphate promotes host defense against bacterial infection via monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocytes/macrophages recruitment [J]. *J Immunol*, 2011,186:5376-5387.
- [7] Ravichandran K S. "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal [J]. *Cell*,2003,113:817-820.
- [8] Bours M, Swennen E L, Virgilio F Di, et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation [J]. *Pharmacol Ther*, 2006,112:358-404.
- [9] Di Virgilio F, Boeynaems J M, Robson S C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity [J]. *Curr Opin Pharmacol*,2009,9:507-513.
- [10] Seiffert K, Ding W, Wagner J A, et al. ATP γ S enhances the production of inflammatory mediators by a human dermal endothelial cell line via purinergic receptor signaling [J]. *J Invest Dermatol*,2006,126:1017-1027.
- [11] Vanderstocken G, Bondue B, Horckmans M, et al. P2Y2 receptor regulates VCAM-1 membrane and soluble forms and eosinophil accumulation during lung inflammation [J]. *J Immunol*,2010,185:3702-3707.
- [12] Muller T, Robaye B, Vieira R P, et al. The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation [J]. *Allergy*,2010,65:1545-1553.
- [13] Ben Yebdri F, Kukulski F, Tremblay A, et al. Concomitant activation of P2Y(2) and P2Y(6) receptors on monocytes is required for TLR1/2-induced neutrophil migration by regulating IL-8 secretion [J]. *Eur J Immunol*,2009,39:2885-2894.
- [14] Haynes S E, Hollopeter G, Yang G, et al. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides [J]. *Nat Neurosci*,2006,9:1512-1519.
- [15] Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo [J]. *Nat Neurosci*,2005,8:752-758.
- [16] Elliott M R, Chekeni F B, Trampont P C, et al. Ravichandran. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance [J]. *Nature*,2009,461:282-286.
- [17] Gounaris K, Selkirk M E. Parasite nucleotide-metabolizing enzymes and host purinergic signalling [J]. *Trends Parasitol*,2005,21:17-21.
- [18] Vieira R P, Muller T, Grimm M, et al. Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2011,184:215-223.
- [19] Uratsuji H, Tada Y, Kawashima T, et al. P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals [J]. *J Immunol*, 2012,188:436-444.
- [20] Granstein R D, Ding W, Huang J, et al. Augmentation of cutaneous immune responses by ATP γ S: purinergic agonists define a novel class of immunologic adjuvants [J]. *J Immunol*,2005,174:7725-7731.
- [21] Shin A, Toy T, Rothenfusser S, et al. P2Y receptor signaling regulates phenotype and IFN- α secretion of human plasmacytoid dendritic cells [J]. *Blood*,2008, 11: 3062-3069.
- [22] Ben Addi A, Cammarata D, Conley P B, et al. Role of the P2Y12 receptor in the modulation of murine dendritic cell function by ADP [J]. *J Immunol*,2010,185: 5900-5906.
- [23] Wang L, Jacobsen S E, Bengtsson A, et al. P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34 + stem and progenitor cells [J]. *BMC*,2004,Immunol5:16.
- [24] Leal D B, Streher C A, Neu T N, et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lympho-

- cytes[J].*Biochim Biophys Acta*,2005,1721:9-15.
- [25] Filippini A, Taffs R E, Sitkovsky M V. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1990, 87:8267-8271.
- [26] Schenk U, Westendorf A M, Radaelli E, et al. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels[J]. *Sci Signal*,2008,1:ra6.
- [27] Yip L, Woehrle T, Corriden R, et al. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors[J]. *FASEB J*,2009,23:1685-1693.
- [28] Woehrle T, Yip L, Elkhali A, et al. Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse[J]. *Blood*,2010,116:3475-3484.

Purinergic Receptors P2Y and Its Advance in Immune Response

ZHANG Zhi, LI Zai-xin, ZHAO Zhi-ping, XIE Wan-ru, LIU Zhang-qin

(School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: P2Y receptors are a family of purinergic receptors, G protein-coupled receptors stimulated by extracellular nucleotides such as ATP, ADP, UTP, UDP and UDP-glucose. P2Y receptors are present in almost all human tissues where they exert various biological functions based on their G-protein coupling. In recent years, evidences also has been shown that P2Y receptors play a key role in immune response, such as innate immunity and adaptive immunity.

Key words: purinergic receptors; extracellular nucleotides; signaling pathway; immune response; inflammation